



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12M 1/00, C12N 15/09, C12Q 1/68</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/11754</p> <p>(43) 国際公開日 1999年3月11日(11.03.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/03852</p> <p>(22) 国際出願日 1998年8月28日(28.08.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/234145 1997年8月29日(29.08.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) オリンパス光学工業株式会社 (OLYMPUS OPTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒151-0072 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 陶山 明(SUYAMA, Akira)(JP/JP) 〒192-0372 東京都八王子市下柚木3丁目2番6-501 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 鈴江武彦, 外(SUZUYE, Takehiko et al.) 〒100-0013 東京都千代田区霞が関3丁目7番2号 鈴榮内外國特許法律事務所 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: DNA CAPILLARY</p> <p>(54)発明の名称 DNAキャピラリイ</p> <p>(57) Abstract An apparatus for detecting nucleic acid molecules such as target DNAs or mRNAs by using DNA probes. Specifically a DNA capillary consisting of a passage made of a cylindrical glass capillary (4), a number of independent probe regions formed on the inner wall of the passage, and various DNA probes (1a, 1b, 1c...) different from each other and immobilized on the probe regions. Assay is made by supplying a sample into the capillary (4) from the injection opening (2a) and reacting the same followed by fluorometry, etc.</p>		

(57)要約

本発明は、DNAプローブを用いたターゲットDNA、mRNA等の核酸分子を検出するための装置に関する。本発明は、ガラス製で且つ円筒状のキャピラリィ4で形成された流路と、該流路の内壁に設けられた独立した複数のプローブ領域と、該プローブ領域に固定化された夫々異なる種々のDNAプローブ1a、1b、1c・・・とを具備するDNAキャピラリィを提供する。測定を行うには、資料をキャピラリィ4の注入用開口部2aから導入して、反応させた後、蛍光測定等を行う。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノルウェー		
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		

明細書

DNAキャピラリー

〔技術分野〕

- 5 本発明は、DNAプローブを用いたターゲットDNA、ターゲットmRNA等を検出するための装置に関する。

〔背景技術〕

- 近年、ヒトゲノムプロジェクト、即ち、ヒトの全遺伝子における塩基配列を解析しようとする試みが世界的規模で進行している。塩基配列の決定（シーケンシング）を含むヒトゲノム解析は非常に煩雑で、且つ膨大な手間を要する作業であるが、該プロジェクトは21世紀初頭には完了すると言われている。ヒトゲノムプロジェクトの推進には、解析機器の改良および自動化に加えて、多くの新規技術の開発が大きく寄与している。この新たに開発された解析技術の一例として、DNAチップ技術が挙げられる。
- 10
- 15

- DNAチップとは、半導体分野で使われるリソグラフィ技術を応用することにより、基板（例えばシリコン）上の所定位置に多種類のDNAプローブを配置したものである。ここで用いられるDNAプローブとは、DNAを構成する4種類の塩基、即ちアデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）およびチミン（T）により構成される所定の配列をもったオリゴヌクレオチドである。その配列は、ターゲットとするDNAまたはmRNAの塩基配列に対して相補的である。例え
- 20
- 25

ば、A G C T T (5' → 3') の配列を D N A プローブに使用すれば、この配列に対して相補的な塩基配列 A A G C T を有する D N A が、該 D N A プローブとハイブリダイズして選択的に捕捉される。なお、D N A プローブの実際の構成単位は、上記の塩基部分を有するヌクレオチド（塩基部分 + デオキシリボース部分 + リン酸エステル部分）であるが、説明を簡略化するために、以下の説明では塩基のみでヌクレオチドを表すことにする。

D N A プローブを基板上に固相化する方法の一例は、Science 251:767-773 (1991 年 2 月発行) に示されている。この方法では、光反応を利用して、実質的に平坦な基板上に D N A プローブを構成する。図 1 を参照して、この方法に従って 4 塩基長の D N A プローブをシリコン基板上に形成する方法を簡単に説明する。

まず、シラン処理を施すことにより、アミノ基をシリコン基板 S 上の表面に形成し、続いて各アミノ基に光保護分子 X を結合させる。次いで、第一のマスク (M_1) を用いることにより、所望の位置に選択的に紫外線を照射する。これにより目的の位置の保護基 (X) が外れ、アミノ基が露出される (図 1 a)。次に、光保護基を伴った任意の D N A 塩基 (ここでは K で示す) を、露出したアミノ基に反応させる (図 1 b)。その結果、基板上のアミノ基に、光保護基 X を伴った塩基 K が結合した部分と、光保護基 X のみが結合した部分とが形成される (図 1 c)。更に、第二のマスク (M_2) を通して、アミノ基に光保護基 X のみが結合した部分に対して

選択的に光を照射することにより、照射部分の光保護基 X を選択的に除去する。続いて、光保護基 X を伴った任意の DNA 塩基（ここでは L で示す）を、露出したアミノ基に結合させる（図 1 d）。その結果、光保護基 X を伴う塩基 K と塩基 L とが、それぞれアミノ基（図示してない）を介して基板表面に固定される（図 1 e）。更に、同様な操作を、任意の DNA 塩基（ここでは M で示す）と任意の DNA 塩基（ここでは N で示す）を用いて行う。その結果、2 塩基長の DNA プローブが基板表面に固定される。更に、同様な操作を繰り返し、3 次元的に塩基を積み重ねることにより、図 1 f に示すように、処理単位ごとに異なる塩基配列を持つ 4 塩基長の DNA プローブが構築される。例えば 8 塩基長の塩基配列を形成する場合は、32 枚のマスクを用いたリソグラフィおよび光反応を 32 回繰り返すことにより、全ての塩基配列組をもった DNA プローブを基板上に形成することが出来る。この技術を利用すれば、理論的には、任意の塩基長および任意の塩基配列を有する DNA プローブを、一つの基板上に効率よく構築することができる。

また、DNA チップを製造する改良法が、国際公開 W O 9 3 / 0 9 6 6 8 号（特表平 7 - 5 0 6 5 6 1 号）に記載されている。この方法は、フロー式チャネルブロックを用いて、アミノ基の形成されたシリコン基板上に DNA プローブを固定する方法である。ここで用いられるフロー式チャネルブロックは、複数の細長いチャネルを有する型板である。これを用いることにより、それぞれのチャネルに沿って DNA プロ

ープを固定することができる。この場合、DNAプローブの塩基配列は、チャンネル毎には異なるが、1つのチャンネルではその全長に亘って同一である。また、この従来例の好ましい態様では、先ず、アミノ基を付した基板に対して、複数の平行に並んだチャンネルを有するブロックと合接させた後、選択されたDNAプローブの構成単位である塩基を含む処理液を特定のチャンネルに流すことにより、目的とするDNAプローブの1つ目の塩基を固相化する。次に、基板とチャンネルブロックとを互いに所定角度（例えば90度）で相対的に回転させてから、再び基板とチャンネルブロックとを合接させた後に、2つ目の塩基に相当する塩基をチャンネルに沿って固相化する。これらの工程を順次繰り返すことにより、所望の塩基配列からなるDNAプローブが構成できる。この方法を、光反応と組み合わせることで、先に述べたDNAチップを一度に大量に製作することが出来る。上記方法により作成したDNAチップを上記のチャンネルブロックと共に用いることにより、スクリーニングに応用できる。

上記従来DNAチップを製造するためには、既に述べたように、プローブ固相化する際に、平坦な基板上で多数の試薬を交互に反応させる必要がある。また、このDNAチップを用いた測定時には、試料との反応や洗浄を行うために、平坦なDNAチップ表面に液体を何度も作用させる必要がある。平坦な基板（またはDNAチップ）について上記の処理を行うには、反応液を入れた容器にこの基板（またはDNAチップ）を浸漬しなければならない。或いは、上記のチャンネルブ

ロックのような追加の治具を用いることにより、DNAチップ表面に流路を形成した後で液体処理を行う必要がある。しかし、浸漬する方法では、固相化および試料の測定に際して、余剰量の各種処理液を必要とする問題がある。他方、流路を適用する方法では、DNAプローブを固相化したDNAチップの表面のうち、限定された領域しか使用されないため、作成されたDNAチップを十分に利用できない問題がある。更に、DNAチップは、プローブを形成した表面が露出しているオープン系であるため、表面に汚染が生じ易く、取り扱いが不便であるという欠点を有していた。

上記の問題に加えて、上記従来のDNAチップ技術には別の問題がある。即ち、これらの従来技術は、未知の塩基配列を持つDNAを対象としたシーケンシングを行うためには有力な方法であるが、将来的に重要なmRNAの発現パターン分析には適さない。以下、この問題について説明する。

最近の遺伝子研究では、配列決定それ自身よりも、ポストゲノムの観点から、配列決定により得られたDNA情報を如何に利用するかがより大きな課題になっている。その一例として、DNAの発現について研究するために、mRNA発現パターンの解析が盛んに行われている。或る遺伝子に関するmRNAの発現は、各臓器によって発現レベルが異なり、同一の細胞でも、時期的要因および特定の疾患要因等によって発現のレベルは異なってくる。このような同一固体におけるmRNA発現レベルの相違、即ち発現パターンを解析することは、遺伝子診断、遺伝子治療、医薬品開発、並びに農・畜

産業などの多くの分野で応用が可能であり、今後の更なる発展が期待されている。

- 一般に、mRNA発現パターンの解析には、ターゲット遺伝子に関するmRNAの定量が必要である。そのために、測定すべきmRNAまたはそのcDNA（これはmRNAからの逆転写によって得られる）を、これに対して相補的な塩基配列を有するDNAプローブと反応させ、両者をハイブリダイズさせることにより検出する方法が用いられる。このような研究では、複数のmRNAの発現レベルが測定されるから、通常は、これら複数のターゲットmRNAに対応した複数のDNAプローブが用いられる。また、mRNA発現パターンの研究においては、測定対象となるmRNAまたはcDNAの塩基配列はある程度既知であるから、測定の正確さおよび効率性を考慮して、20～60塩基程度、好ましくは40塩基程度の比較的長いDNAプローブを用いることが可能であり、実際に用いられる。従来のDNAチップ技術によってこのような長さのプローブを構成するためには、80～240枚のマスクを準備し、リソグラフィと光反応による塩基の合成を80～240回繰り返す必要があり、多大な労力が必要になるという問題がある。更に、測定精度を向上するためにはDNAプローブの長さを揃えることが必要であるが、従来の方法を用いた場合、各段階での合成収率を考慮すれば、40塩基長の長さが揃ったDNAプローブを基板上で直接合成することは実質的に不可能である。
- 一方、一つの細胞に存在する約10万個の遺伝子のうち、

mRNAを発現している遺伝子は2～3万種類と考えられている。これら遺伝子のうち、発現パターンの研究において重要な細胞特異的な遺伝子の割合は、数%（1～3%程）程度であると推測されているので、測定対象となり得るmRNA
5 またはそのcDNAの種類は、数百ないし千程度と考えられる。先に述べた従来のDNAチップ技術によれば、8塩基長の長さのプローブを1基板上に 4^8 種類、すなわち65,536種類形成できるが、測定対象となり得るmRNAの種類は最大でも2～3万程度、実際にはその1/10以下と想定されるから、実際にはそのような膨大な種類のプローブを形成する
10 必要はない。

更に、DNAプローブと、測定対象であるmRNA（またはそのcDNA）断片とのハイブリダイゼーションにおける熱安定性は一様ではない。加えて、測定装置のダイナミック
15 レンジを考慮すれば、被検試料中の濃度が大きく異なる膨大な種類のターゲットmRNA（またはcDNA）断片を含む被検試料について、これらを一度に処理して検出することは不可能である。従って、同一測定条件の下に膨大な種類のDNA
20 プローブを準備したとしても、その中で有効な結果を生じるは極く一部に過ぎない。このことから、上記のように膨大な種類のDNAプローブを同一基板上に形成する必要は無いことが理解されるであろう。

更に、前述した従来のDNAチップ技術では、DNAプローブを形成するために光反応による合成を繰り返さなくては
25 ならないので、DNAプローブの紫外線による劣化が問題と

なる。従って、従来のDNAチップ技術は、20塩基長以上のDNAプローブを形成する方法としては適さない。

〔発明の開示〕

- 5 本発明の第一の目的は、汚染に強く、取り扱いが簡便である効率性に優れたDNAプローブ装置を提供することである。また、本発明の第二の目的は、余剰量の各種処理用液体を必要とせずにDNAプローブを固相化でき、且つ、利用面積が増大化されたDNAプローブ装置を提供することである。本
- 10 発明の第三の目的は、複数のターゲットDNA等を一度に検出できるDNAプローブ装置を提供することである。本発明の第四の目的は、mRNAの発現パターンの解析に適したDNAキャピラリィを提供することである。

- 上記の第一の目的ないし第四の目的は、少なくとも一部が
- 15 光透過性を有する壁で限定された流路と、該流路の内壁に設けられた夫々が独立した複数のプローブ領域と、該プローブ領域の夫々に固定されたDNAプローブとを具備し、前記複数のプローブ領域に固定されたDNAプローブが各領域毎に異なっているDNAキャピラリィによって達成される。

- 20 本発明の一つの側面において、前記流路は、その末端部が開放されている中空状のキャピラリィであることが好ましい。また、前記流路は、筒形状のキャピラリィであることが一層好ましい。筒形状で且つ末端部のみが開放された形態をとることにより、DNAキャピラリィは閉鎖系となり、汚染に対
- 25 して非常に強く、取り扱いが簡便なDNAキャピラリィを提

供できる。

本発明のもう一つの側面において、複数の前記流路は一体化されて配置されるのが好ましい。これにより、DNAプローブの固相化処理や被検試料に対する処理能力等が向上する。

- 5 特に、複数の流路の全てが、少なくともその一方の末端部付近で合流路と連通していれば、前記処理に際し、該合流路を通じて各種処理用液体を一括して導入、または回収することが可能であるので有利である。

- 10 本発明の更にもう一つの側面において、前記複数のプローブ領域は、一つの流路内でその流路に沿って相互に分離された環状の領域にとして配置するのが好ましい。これにより、一つの流路に被検試料を含む処理用の液体(場合によっては、乾燥のため等に用いる気体)を1度流しただけで、複数の異な
- 15 ったDNAプローブに対して同時に処理することが可能であるので効率的である。更に、本発明のDNAキャピラリィにおいて、相互に分離された環状のプローブ領域の各領域に配置される異なるDNAプローブは、キャピラリィにより形成される筒型の内壁全周に亘って環状に配置されるのが好ましい。このようにすることにより、従来の平面を用いたDNA
- 20 Aチップに比較して利用面積が広くでき、少量の被検試料を用いた場合でも効率よくターゲット物質を捕捉することが可能となる。

- また、本発明のDNAキャピラリィにおいて、前記流路を、ガラスまたはシリコン基板上にエッチング加工することにより形成すれば、複数のキャピラリィを1度に数多く作ること
- 25

ができるので好ましい。加えて、光反応を用いることにより、多数のキャピラリィ中にDNAプローブを同時に固相化することが可能であるので好ましい。

また、本発明は、予め所定の塩基配列と長さで合成しておいたDNAプローブを用いることが好ましい。これにより、
5 本発明の第四の目的であるmRNAの発現パターンの解析に適したDNAキャピラリィが提供される。即ち、ただ1度の光反応の実施でプローブの固相化が達成できるので、20塩基以上の長さのDNAプローブを安定した状態で固相化することが
10 できる。従って、従来のDNAチップ技術では提供することが困難であった、mRNA発現パターンの研究に適した検出装置を提供できる。

〔図面の簡単な説明〕

15 図1A乃至図1Fは、従来のDNAプローブの固相化方法を示すスキームである。

図2は、本発明のDNAキャピラリィの第1の実施例を示す図である。

図3は、DNAプローブをキャピラリィの内壁に固相化する方法を示すスキームである。
20

図4Aおよび図4Bは、本発明のDNAキャピラリィの第2の実施例を示す図である。図4Aは、斜視図であり、図4Bは上から見た平面図である。

図5A乃至図5Hは、本発明のDNAキャピラリィにおいて、半導体加工技術を用いて溝加工する方法を説明する断面
25

図である。

〔発明を実施するための最良の形態〕

実施例 1

5 図 2 に本発明の DNA キャピラリィの第 1 の実施例を示す。
この発明の実施例は次のように構成されている。図 2 は、種
類を異にする DNA プローブ 1 a, 1 b, 1 c … が、注入用
開口部 2 a および排出用開口部 2 b を両端に有する光透過性
の円筒状キャピラリィ 4 の内壁 5 に相互に分離された環状の
10 プローブ領域に固定されている状態を示している。キャピラ
リィ 4 のサイズは、内径として約 0.1 mm から約 5 mm まで
の種々のサイズを用いることが可能であるが、取り扱いの容
易さから 0.5 mm から 1 mm 程度のものが好適である。ま
た、キャピラリィ 4 の流路長は、約 5 mm から約 100 mm
15 が好ましい。キャピラリィ 4 の内径や流路長は、測定する試
料の用量や液体の流動性に応じて決定すればよい。

キャピラリィ 4 の内部に固定するプローブは、予め合成し
ておいた所望する塩基配列からなり、20 塩基以上、好まし
くは 20 ~ 60 塩基、特に 40 塩基付近（例えば、35 ~ 4
20 5 塩基）のものが好ましい。1 キャピラリィに固定するプロ
ーブの種類の総数は、目的によって異なり、1 試料中の測定
対象となる mRNA、または mRNA から転換した cDNA
の数に依存する。本発明で 1 試料中に含まれる好ましい測定
対象の数は、1 種類から数千種類までである。また、本発明
25 の一目的である mRNA の発現パターンを解析するためには、

数千種類のDNAプローブを固定する必要があり、他方、例えば感染症などの検査を目的とする場合には、1から数種類のDNAプローブを固定すれば十分である。

各DNAプローブ1a, 1b, 1c…の間隔は、測定対象
5 の数が多い場合は密にすればよく、反対に、測定対象の数が少ない場合には、その間隔を広く取ることができる。実際には、20～60塩基長程度からなるDNAプローブを複数種類用いて、相互に分離された環状のプローブ領域に各々種類ごとに配置するためには、約1μmから約5mmまでの種々
10 の間隔で、各DNAプローブ1a, 1b, 1c…を配置することができる。必要に応じて、同種のDNAプローブを複数固定化したり、対照用のタンパクを固定化することも出来、これにより測定の多様性が増す。測定対象が微量である場合を考慮して、通常、DNAキャピラリィを用いた測定に
15 は、発光や化学発光を利用した光増感方式を採用することが好ましい。キャピラリィ4に固定化した各DNAプローブ1a, 1b, 1c…の間隔が密であるときは、蛍光顕微鏡等のような高い分解能を有する測定手段を用いて、複数の反応パターンを個別に読み取る必要がある。一方、数mmの粗い間
20 隔であれば、トランスイルミネータを用いて、肉眼で観察することが可能である。このような光測定を容易にするためには、光透過性に優れた任意の部材（プラスチック類、シリカ、ガラス、ポリマー等）からなるDNAキャピラリィを使用すべきである。特に後述するシラン処理（DNAプローブを
25 固定化するための1ステップ）による製造方法を行うにはガ

ラス或いはシリコンが好適である。必要ならば、部分的に光反射性または遮光性であってもよい。市販のガラスキャピラリーを利用すれば、DNAキャピラリーを安価に製作することができるので有益である。また、プラスチック類をキャピラリーとして用いる場合は、DNAプローブを結合するための手段としてのOH基を有するものを用いることによりシラン処理剤を使うことができる。しかし、これに限られるわけではなく、DNAプローブを結合するための手段を有したプラスチック類であれば如何なるものも使用可能である。

次に、DNAキャピラリーの製造方法について説明する。図3は、種々のDNAプローブ1a, 1b, 1c...をガラスキャピラリー4の内壁5に固定化する方法を示している。後述の各製造プロセスにおける、各種処理用液体の適用は、キャピラリーの注入用開口部2aから適宜の分注手段による導入と、処理後における、排出用開口部2bからの適宜な吸引手段による液体の排出とによって行なわれる。ここで、分注手段としては、ピペッティング等の吐出手段であっても、また、他の所望する何れの手段をも用いることが可能である。また、吸引手段としては、所望する如何なる吸引手段をも使用可能である。また、毛管力による自然注入および自然排液も可能である。

以後図3のスキームに沿って製造方法を説明する。まず、シラン処理のためのシランカップリング剤を含む溶液をキャピラリー4中に適用し、アミノ基(NH_2)6を内壁5の表面に形成する(S1)。続けて、特定波長の光、好ましくは

紫外線で光分解を起こすキャッピング剤 7 を含む溶液をキャピラリィ 4 中に適用し、内壁 5 表面の全アミノ基にキャッピング剤 7 を結合する (S 2)。次に、DNA プローブ 10 を固定化しようとする領域に対してのみ紫外線 8 を照射し、それにより、その部分のキャッピング剤 7 を分解し、アミノ基を露出させる (S 3)。ここで、特定の場所だけに紫外線 8 を照射するための方法は、半導体分野のリソグラフィ技術で
5 使用される、マスク部材により特定の場所以外を遮光する方法、またはレンズ等を用いて照射する光の照射範囲を絞り込む方法が用いられる。また、キャピラリィ 4 は円筒形状であるので、キャピラリィ側面に対して略直角に入射できる角度であれば、任意の方向から照射ができる。更に、キャピラリィ 4 は、全体が光透過性であるので、紫外線照射された領域で、内壁 5 はリング状に脱保護される。次に、リンカー分子
10 9 を含む液体をキャピラリィ 4 に適用する (S 4)。ここで用いるリンカー分子とは、内壁 5 に結合するアミノ基 6 と DNA プローブ 10 との間に位置し、それらを相互に結合することにより、それらを連結する分子のことを言う。リンカー分子 9 は、その一端にアミノ基と反応して結合する結合性部分を有し、他端にアミノ基若しくはチオール基と反応して結合する結合性部分を有す。キャピラリィ 4 に適用されたリン
20 カー分子 9 は、一方の結合部分によりアミノ基 6 と結合する (S 4)。この時、他方の結合部分はフリーの状態である。続いて、末端部にアミノ基またはチオール基を形成した DNA
25 A プローブ 10 を含む液体を導入し、リンカー分子 9 に結合

させる (S 5)。なお、適宜、洗浄液を適量用いて、キャピラリィ 4 内を洗浄するプロセスを介しながら、上記 (S 3)、(S 4)、(S 5) の固定化プロセスを行ってもよい。更に、所要の距離を隔てた別の場所に対して上記プロセスを繰り返すことにより、図 2 に示すような DNA キャピラリィ、即ち、目的の場所に目的の DNA プローブ 1 a、1 b、1 c . . . を、各々リング状に、独立して固定化した DNA キャピラリィを制作することができる。ここで使用するリング状または環状の語には、中空状流路の断面形状に応じて円形、多角形、楕円形等の種々の形が含まれる。また、ここで使用される流路とは、少なくとも所要量の処理用液体が流れる幅と高さを有するものを言う。更にこの流路は、好ましくは毛管力による流動促進作用が得られるように選ばれる。従って、単に、凹凸の隆起が形成された表面のことを流路とは呼ばない。

5 なお、(S 1) で用いられるシランカップリング剤としては、例えばアミノエチルアミノピロピルトリメトキシシラン等が用いられる。しかし、これに限定されるものではなく、アミノ基を表面に形成できるようなものであれば如何なるものも使用でき、例えば、アミノエチルアミノピロピルメチルジメトキシシラン等のアミノシラン類も利用可能である。

10 (S 2) で用いられるキャッピング剤としては、4, 5-D i m e t h o x y - 2 - n i t r o b e n z y l c h l o r o f o r m a t e、6-N i t r o v e r a t r y l c h l o r o f o r m a t e、4-N i t r o b e n z y l c h l o r o f o r m a t e、o-N i t r o b e n z y

15 c h l o r o f o r m a t e、o-N i t r o b e n z y

1-p-nitrophenyl carbonate等が用いられる。しかし、これらに限られるものではなく、紫外線または可視光によりアミノ基との結合が外れるような分子内開裂を示す物質であれば何れも用いることが可能である。

5 (S3) で用いられる光は、通常 350 nm 前後の光であるが、キャッピング剤や用いる溶媒の種類に応じて、最適な光分解性を得られる波長帯の光を選択してよい。また、紫外線のような特定光を照射するための光学装置は、市販のものが利用できる。

10 (S 4) で用いることが可能なリンカー分子 9 には、D i
s u c c i n i m i d y l s u b e r a t e 等の h o m o
b i f u n c t i o n a l N - h y d r o x y s u c c i
n i m i d y l (N H S) e s t e r s グループ分子や D i
m e t h y l a d i p i m i d a t e - 2 - H C L 等の h o
15 m o b i f u n c t i o n a l i m i d o e s t e r s グ
ループ分子がある。また、本実施例で用いたリンカー分子は、
分子の両末端にアミノ基と反応するスクシンイミド基を有し
ているが、これら両末端の官能基は異なってもよい。例
えば、その一方は、チオール基やカルボキシル基と反応する
20 ような反応基を有するリンカー分子を用いることも可能であ
る。

(S5) で用いられるDNAプローブ10には、合成時にDNAの5'末端にアミノ基またはチオール基を付与したものが用いられる。アミノ基またはチオール基の付与は、市販のDNAシンセサイザーの専用キットを用いて容易に行うこ

とが可能である。DNAプローブ10に用いる塩基配列は、遺伝学的、生化学的または免疫学的、病理学的に有意義な任意の配列とハイブリダイズするものが選択されるが、何れの配列も選択可能である。

- 5 キャピラリィ4の内壁5に対する(S1)、(S2)、(S3)、(S4)および(S5)の各プロセスでの処理条件は、使用するキャピラリィの材質、形状、サイズまたはDNAプローブの種類に応じて適宜設定すればよい。

- 10 製作したDNAキャピラリィを用いて測定を行うには、注入用開口部2aおよび排出用開口部2bを通じて、試料や試薬等の処理用液体の注入および排出を行えばよい。ここで、排出用開口部2bからの排出時期を種々変更することによって、所望の反応時間を得ることが可能となる。例えば、試料をキャピラリィ4の一端の開口から導入し、DNAの融点(T_m 値)から10～15度低い温度で反応させる。次に、キャピラリィを洗浄するための洗浄液で洗浄操作を行った後、これを蛍光測定等に供する。ここで使用する洗浄液は、使用温度や組成を適宜変えることにより、ストリンジェンシーを調節したものが望ましい。試料の測定に関与するプロセスが、固定化したDNAに対するハイブリダイゼーション反応を含む場合には、試料中のDNAをハイブリダイゼーションできる状態に調製した上で、DNAキャピラリィに適用する。ここで使用する試料とは、測定対象である生物学的材料が、それ自身液状のもの、または適宜の溶液に溶解若しくは懸濁することにより液状化したものをいう。従って、試料としての液
- 15
- 20
- 25

体の状態は任意である。

また、本実施例では 1 本のキャピラリィを用いて行った例を示したが、複数本並列させるか束状にして同時に処理することも可能である。複数のキャピラリィの配置は任意であるが、測定に関与する一部または全部のプロセスにとって都合の
5 のよい配置とするのが好ましい。

なお、上述した実施例 1 では、光反応を 1 回行い、DNA プローブを固定化しているが、所望に応じて、任意の回数だけ光反応を行って該キャピラリィに DNA プローブを構築する
10 ことも可能である。

実施例 2

図 4 に本発明の DNA キャピラリィの第 2 の実施例を示す。これは、複数の DNA キャピラリィを効率よく製作するのに
15 適した優れた形態である。より詳細に言えば、複数の流路を 1 度に多数作成することが可能であり、更に、複数の流路に対して DNA プローブを同時に固相化することも可能である。この第 2 の実施例を説明の便宜上 DNA キャピラリィアレイ 2 4 と称す。

図 4 (a) は全体像、図 4 (b) は上から見た平面図である。DNA キャピラリィアレイ 2 4 の本体は、ガラス又はシリコン等の材料から作成した下側基板 1 6 a と上側基板 1 6 b とを接着した基板 1 6 である。下側基板 1 6 a 上には、図示する
20 ようなパターン of 溝が設けられており、これらによって複数の DNA キャピラリィ 1 3 a、1 3 b、1 3 c . . .
25

が形成されている。また、下側基板 16a と同時に上側基板 16b にも同様なパターンの溝があってもよい。図 4 (b) に示すように各々の DNA キャピラリィ 13a、13b、13c・・・の一端は、個別出入口 14a、14b、14c・・・の真下まで延在し、各個別出入口 14a、14b、14c・・・を通じて外気に開放されている。他端は、合流路としての連結流路 17 で 1 つに連結され、共通出入口 15 の真下まで延在し、この共通出入口 15 を通じて外気に開放されている。個別出入口 14a、14b、14c・・・および共通出入口 15 は、例えばスクリーン印刷技術を利用して接着剤を所定の位置に薄膜状に形成して、ガラス管等の管状部材を接着することにより形成することが出来る。DNA プローブ 12a、12b、12c・・・は、図示するように各々の DNA キャピラリィ 13a、13b、13c・・・の流路上に、相互に分離された環状のプローブ領域に配置される。

DNA プローブの固定化プロセスには、第 1 の実施例で述べた光反応を利用した方法が同様に使用できる。同様な方法を用いても、第 2 の実施例では、複数のキャピラリィに対して、一度に各処理を行える利点もある。即ち、DNA プローブの固相化に用いる固相化用処理液を共通出入口 15 から連結流路 17 を介し、複数の DNA キャピラリィの各々に同時に供給できる。また、それら処理液の排出も、共通出入口 15 を通じて一括して行なうことができる。

また、キャッピング剤を分解するための紫外線による露光プロセスも複数のキャピラリィに対して一度に行うことが可

能である。即ち、適宜の紫外線照射手段を該DNAキャピラリーの上方に設置する。好ましくは、紫外線照射手段は走査型であり、DNAキャピラリー13a、13b、13c・・・に直交し、且つ用意した複数のキャピラリー全てに架かる走査長を有し、更に、前記キャピラリー全てに亘ってライン状に紫外線を照射できる手段が好ましい。これをX方向（DNAプローブが固相化される流路に対して平行な方向）および/またはY方向（該流路に対し直交する方向）に自由に移動することにより、DNAキャピラリー13a、13b、13c・・・をスキャンしながら、ライン状に紫外線を照射する。このプロセスにより、同時に全てのDNAキャピラリー13a、13b、13c・・・の特定の場所に対してライン状に紫外線照射が達成される。該照射によるキャッピング剤の除去に続いて、第1の実施例で述べた更なるステップを経ることにより、DNAプローブ12aを固相化する。本実施例では、下側基板16aが光透過性でなくとも、少なくとも上側基板16bが光透過性であれば、下側基板16aおよび上側基板16bにより形成される流路の所望する位置の壁面が、環状に露光されるので、露光に応じて環状にDNAプローブが固相化される。更に、該照射手段を、DNAキャピラリー13a、13b、13c・・・に対して平行なX方向に所定間隔分だけ移動した位置に、同様のスキャン照射と、DNAプローブ12bの固相化を行って、2種類目のDNAプローブを固相化する。更に、以上の操作を繰り返すことにより、図4に示すように独立して配置した複数のDNAプローブ領

域、即ちDNAプローブ領域12a, 12b, 12c・・・を形成することが出来る。なお、上述した露光プロセスにおいて、スキヤニングの軌跡上で露光を避けたいDNAキャピラリィがある場合には、例えば紫外線照射手段による照射の有無を適当なスイッチ回路により選択的に切り替えるようにして回避してもよい。これにより、スキヤニングの際に紫外線が照射されないように操作することができる。これにより各DNAキャピラリィ毎に異なる組合せでDNAプローブを固相化できるので、測定項目の多様化が図れる。その結果、

5 1 試料に対して多項目を測定する場合、または複数試料について異なる多項目を測定する場合等、必要最小限の項目についてのみ測定を実施することが可能となるので有益である。それに加えて、DNAキャピラリィ製造段階においても、必要のないDNAプローブを固相化しなくて済むので材料の無駄が省ける。また、全DNAキャピラリィ13に夫々同じ組合せのDNAプローブを固相化すれば、最大キャピラリィ数と同数の試料に対して同時に同じ測定を実施できる。

10 15

更に、上記の固相化プロセスにおいて、共通出入口15を通じてDNAキャピラリィ13a, 13b, 13c…に導入された固相化用処理液のうち、特に、DNAプローブを含む液体（図3のS5参照）及びそれに続く洗浄のための洗浄液については、個別出入口14a, 14b, 14c・・・から個別に排出することが好ましい。そうすることによって、異なった液を複数用いる際に起きるコンタミネーションの影響

20 25

を極力避けることが可能である。また、試料を測定する際に

は、個別出入口 14 a, 14 b, 14 c . . . から試料等を注入して測定を行うことが好ましい。その結果、各液を、互いに異なる他の液から完全に分離した状態で、流動出来るので測定精度が向上する。

- 5 DNAキャピラリィ 13 は、用途に合わせて種々の大きさに加工することができる。実用的には幅が $10\ \mu\text{m} \sim 5\ \text{mm}$ 、深さ $1\ \mu\text{m} \sim 500\ \mu\text{m}$ 、長さが $5\ \text{mm} \sim 100\ \text{mm}$ 、DNAキャピラリィの間隔 $10\ \mu\text{m} \sim 5\ \text{mm}$ 程度で充分であろう。但し、一般的に、測定対象となる mRNA、または mRNA
- 10 から転換した cDNA の拡散速度は毎秒約 $5\ \mu\text{m}$ と遅いので、反応の効率性を考えると、DNAキャピラリィ断面形状は、幅を広くしても深さは浅くするような扁平構造をとることが好ましい。それにより、反応時間の短縮、試料の微量化、観察時の視野の増加等が期待できる。
- 15 DNAキャピラリィ 13 a, 13 b, 13 c . . . の溝部分を製造するための、物理的な加工方法には、エキシマレーザエッチング、フォトリソグラフィによるエッチング等の様々な方法を用いることが可能である。1例として、半導体加工技術を用いた溝加工の方法について、図5のスキームに
- 20 沿って説明する。

先ず、シリコンウエハー基板 20 に酸化膜 19 を $5000\ \text{\AA}$ 程度形成し、さらにレジスト膜 18 を形成する (a)。次に、シリコンウエハー基板 20 上の溝パターンに応じたマスクを製作し、アライナーを用いてレジスト露光を行って現像

25 する (b)。次に、パターニングされたレジスト膜 18 を用

いて、酸化膜 19 のエッチングを行う (c)。このエッチングには、フッ化水素酸とフッ化アンモニウムを 1 : 9 程度に混合した溶液を用いる。次に、レジスト膜 18 を除去する (d)。この除去には、硫酸と過酸化水素溶液の混合液や酸素プラズマによる方法が用いられる。次に、パターンニングされた酸化膜 19 を用いてシリコンウエハー基板 20 のエッチングを行う (e)。この時のエッチング方法としては、等方性、異方性のウェットエッチングや、プラズマを用いたドライエッチングなどの既存の様々な方法が適用可能である。次に、酸化膜 19 を除去する (f)。この場合、単に除去するだけであるので、例えばフッ化水素酸溶液を 50 % に純水で希釈した溶液に曝すことにより行える。最後に、エッチングされた溝部分も含めて、シリコンウエハー基板 20 の周囲をシリコン酸化膜 21 で覆う (g)。

15 以上の方法により、溝の物理的な加工は達成できるが、更に、図 5 h に示すように、光透過性の蓋 23 を接合すれば、図 4 で示したような個別出入口 14 a、14 b、14 c・・・および共通出入口 15 を設けた DNA キャピラリィのアレイを形成することが出来る。図 4 a で示された基板 16 は、図

20 5 h では酸化膜 21 で覆われたシリコンウエハー基板 20 と蓋 23 とに相当する。なお、蓋 23 の接合には、陽極接合法を用いることが出来る。陽極接合法とは、500℃程度に加熱しながらシリコンウエハー基板 20 と蓋 23 に 1000 V の電圧を印加して基板同士を接合する方法で、この方法を使用

25 するためには、シリコンと熱膨張率のほぼ等しいパイレッ

クスガラス等を蓋 23 として用いる必要がある。また、シラン処理は、シリコンウェハー基板 20 と蓋 23 の接合の前でも後でもよい。必ずしも、蓋 23 を同様にシラン処理する必要はないが、蓋 23 も同様のシラン処理を行う方が好ましい。

- 5 その場合、接合前、接合後のどちらにおいて、シラン処理を行ってもよい。それにより、図 4 で示したのと同様に環状に DNA プロブが固相化されるので、固相効率および反応感度上有利である。一方、蓋 23 にシラン処理を行わない場合には、シリコンウェハー基板 20 の溝部分のみに、光反応による DNA プロブの固相化が行われるので、じ字状のプロブ領域が得られる。この場合でも、本発明の DNA キャピラリィアレイとして用いることが可能である。
- 10

- 前述した溝加工では、シリコンウェハー基板 20 を用いたが、シリコン基板に代えて、石英やパイレックスガラスなどのガラス基板を用いることもできる。その場合には、基板のエッチングマスクを酸化膜 19 の代わりに金などの金属マスクを用いる。また、接合についても、そのまま陽極接合法を用いることは出来ないが、間にシリコン薄膜を形成することにより使用可能となる。シリコンウェハー基板 20 のエッチングマスクに用いた酸化膜 19 は、これに限定されることなく、窒化シリコン膜やアルミナ等の膜も利用できる。
- 15
- 20

- このように形成された DNA キャピラリィアレイ 24 は、次のような作用効果を有する。即ち、一度に大量の DNA キャピラリィを形成できるため、低コストであり、扱いが簡便である。また、キャピラリィで形成される流路に対して、紫
- 25

外線照射を行うことにより、環状に脱保護が行われるので、DNAプローブをキャピラリィの内壁に環状で効率良く固定化でき、その結果、試料の測定感度が向上する。また、多くの試料を測定する際にも、DNAキャピラリィが集積化されているため、例えば、個別出入口14a, 14b, 14c・・・からそれぞれ異なる試料を導入して、所要時間のインキュベーションにより生物学的反応をさせた後に、共通出入口15から一括して試料を回収除去できる。更にその後、適宜、洗浄液や測定用試薬を同様の流れにより処理することができるので、自動化し易く、ひいては測定処理能力の高い装置を構成することが出来る。

なお、本発明のDNAキャピラリィは、上述した実施例にとらわれることなく様々な変形を伴った形態で提供され得る。例えば、上述した各実施例では、その製造および試料測定に当たって、いずれも互いに異なる開口部を用いて注入と排出とを行っているので、各々の液体については必ず一方向の流れが存在する。しかし、場合によっては、注入時の開口部と同じ開口部から排液するようにし、注入時の流れとは反対方向に戻すようにしてもよい。また、第1の実施例では、キャピラリィ4への固相化処理用液体および試料測定用液体の注入を、ピペッターのような吐出手段を利用しているが、他の方法も可能である。例えば、所要量の固相化処理用液体または試料測定用液体を各々収容している容器に、直接キャピラリィ4の先端（注入用開口部2a）を付けるだけで、毛管力で自然注入できる。同様に、排液についても、特

別な吸引装置を利用しなくとも高吸水性材料（スポンジ、高吸水性ポリマー等）に先端（排出用開口部 2 b）を接触させるだけで自然排液できる。従って、手動、または自動の何れの場合でも取り扱いが容易である。また、第 1 の実施例のキャピラリィ 4 では、横に寝せた状態での使用、縦に直立させた状態での使用共に同様の作用効果を得られる。縦に直立させた場合には、注入用開口部 2 a 側を上側にした姿勢のまま、上方からの注入を行うとともに排出用開口部 2 b を通じて下方からの排液を行うようにすることもできる。その逆も可能である。

また、第 2 の実施例では、平行に配置した DNA キャピラリィ 1 3 a , 1 3 b , 1 3 c . . . の夫々の一端を連結流路 1 7 で連結している。しかし、各 DNA キャピラリィ 1 3 a , 1 3 b , 1 3 c . . . を放射状に配置して、それらの一端部をいずれも中心付近の共通出入り口 1 5 に連結させ、他端部を同心円上に配置することも可能である。また、複数の DNA キャピラリィ 1 3 a , 1 3 b , 1 3 c . . . を連結流路上 7 で連結せずに、各々独立した流路で構成するようにすれば、複数の試料を効率良く処理する集積化アレイをも提供できる。

また、本発明の DNA キャピラリィは、試料測定以外にも、DNA または mRNA の分離・精製にも利用可能である。更に、本発明の DNA キャピラリィに固相化するプローブは、抗原抗体反応に関与するタンパクを構成するものであってもよい。更に、試料測定に当っては、本件出願前に公知である DNA プローブを用いた任意の反応原理から適宜選択しても

よい。このとき、測定に必要な種々の試薬、例えば蛍光、化学発光物質、発色物質等の標識試薬は、公知の化学分析技術にしたがって利用してよい。必要ならば、選択した反応原理に適した市販の分析装置によって、自動測定することも可能である。

上述した実施例に述べたように、本発明のDNAキャピラリィは、それ自体が液体を流す流路を形成しているため、固相化、測定、分離等の各種反応や洗浄操作が容易に行える。更に、液体処理装置のような種々の液体を連続的に処理するような装置に接続すれば、容易に一連の操作を行うことが出来る。また、予め任意の配列を完全長に合成しておいたDNAプローブを用いることにより、1回の光照射でDNAプローブを固相化できるため、DNAプローブへのダメージを極めて少なくすることが可能である。従って、良好な固相化状態を保てるという優れた利点を有する。更に、光反応によって、複数種類のDNAプローブが、流路に沿って相互に分離された複数の環状プローブ領域内にそれぞれ配置されているので、試料を流路中に導入するだけで複数のDNAプローブに同時に且つ効率よく結合反応させることができる。さらに、DNAプローブを固相化した表面は、キャピラリィの内側に保護されるため、汚染の影響も極めて少なく、且つハンドリングの容易さが期待できる。

なお、上述した実施例2においても実施例1と同様に、1回の光反応により任意のDNAプローブを該キャピラリィに固相化しているが、所望に応じて、任意の回数の光反応を行

い、目的とする塩基配列を持つDNAプローブを構築することも可能である。

〔産業上の利用の可能性〕

- 5 本発明により提供されるDNAキャピラリィは、従来のDNAチップと異なり、DNAの固定化及び測定等を閉鎖系で行うことが可能であるため、汚染に強く、取り扱いが簡便である。更に、毛管力を有しているので、固相化されたDNA
- 10 プローブにより測定を行う際にも、必要な各処理用の流体、例えば試料や洗浄液等の各種液体の取り扱いについても容易である。また、合流路を複数の流路と連結させれば、この合流路を通じて各種処理用液体が一括して導入されるか或いは回収されるので、処理能力が高まる。更に、光透過性の流路
- 15 に光反応を適用することで、環状流路内の固相化面積が増大でき、その結果、微量の試料を用いてより効率よい測定等を実行できる。その上更に、1つの流路に複数の異なるDNA
- 20 プローブが固定化されているので、測定が更に効率的に行える。また、所望する塩基配列を予め合成しておいたDNAプローブを、1回の光反応により固相化することにより、20塩基長以上のDNAプローブを安定して固相化することが可能である。

請求の範囲

1. 少なくとも一部が光透過性を有する壁で限定された流路と、該流路の内壁に設けられた独立した複数のプローブ領域と、該プローブ領域の夫々に固定されたDNAプローブとを具備し、前記複数のプローブ領域に固定されたDNAプローブが夫々異なるDNAキャピラリィ。
2. 前記流路の末端部が開放された中空状のキャピラリィであることを特徴とする請求項1に記載のDNAキャピラリィ。
- 10 3. 前記流路が筒形状であることを特徴とする請求項2に記載のDNAキャピラリィ。
4. 前記流路を複数個有し、且つそれらは一体化されて配置されることを特徴とする請求項1～3の何れか1項に記載のDNAキャピラリィ。
- 15 5. 前記複数個の流路の全てが、少なくとも一方の末端部付近で合流路と連結していることを特徴とする請求項4に記載のDNAキャピラリィ。
6. 前記DNAプローブが、前記流路に沿って相互に分離された環状プローブ領域内に種類毎に独立して配置されることを特徴とする請求項1～5の何れか1項に記載のDNAキャピラリィ。
- 20 7. 前記流路が、ガラスまたはシリコン基板上にエッチング加工されて形成されることを特徴とする請求項1～6の何れか1項に記載のDNAキャピラリィ。
- 25 8. 前記DNAプローブが、光反応を用いて固定されるこ

とを特徴とする請求項 1 ～ 7 の何れか 1 項に記載の DNA キャピラリー。

9. 前記 DNA プローブは、固定前に所定の塩基配列を有するように合成され、且つ 1 回の光反応を用いることにより

- 5 前記プローブ領域に固定されていることを特徴とする請求項 8 に記載の DNA キャピラリー。

1/5

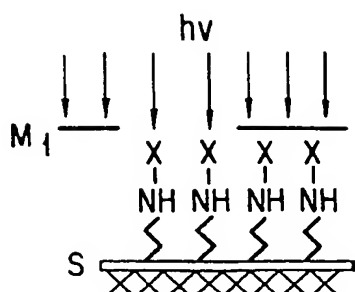


FIG. 1A

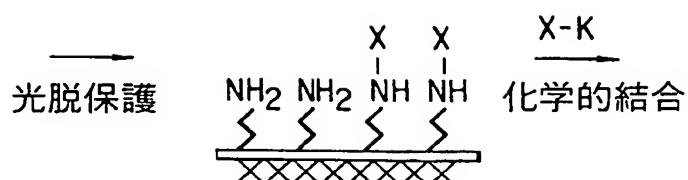


FIG. 1B

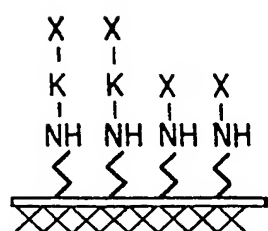


FIG. 1C

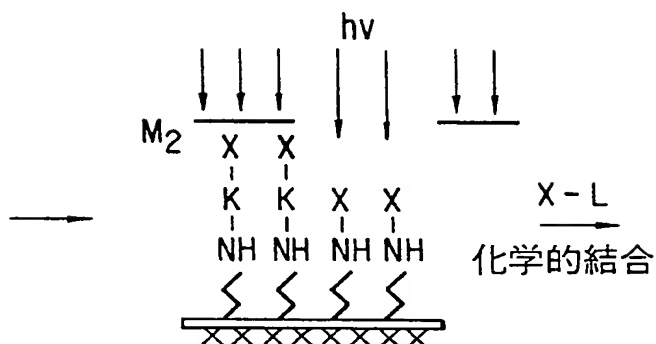


FIG. 1D

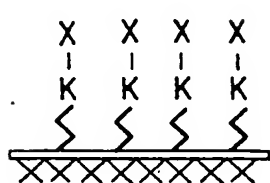


FIG. 1E

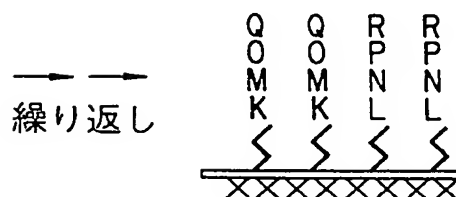


FIG. 1F

2/5

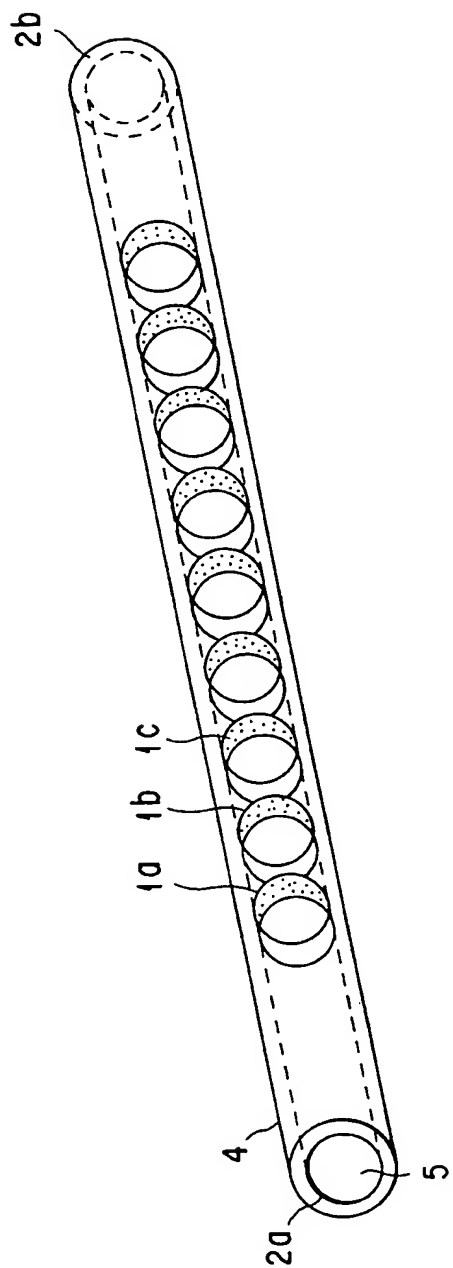


FIG. 2

3/5

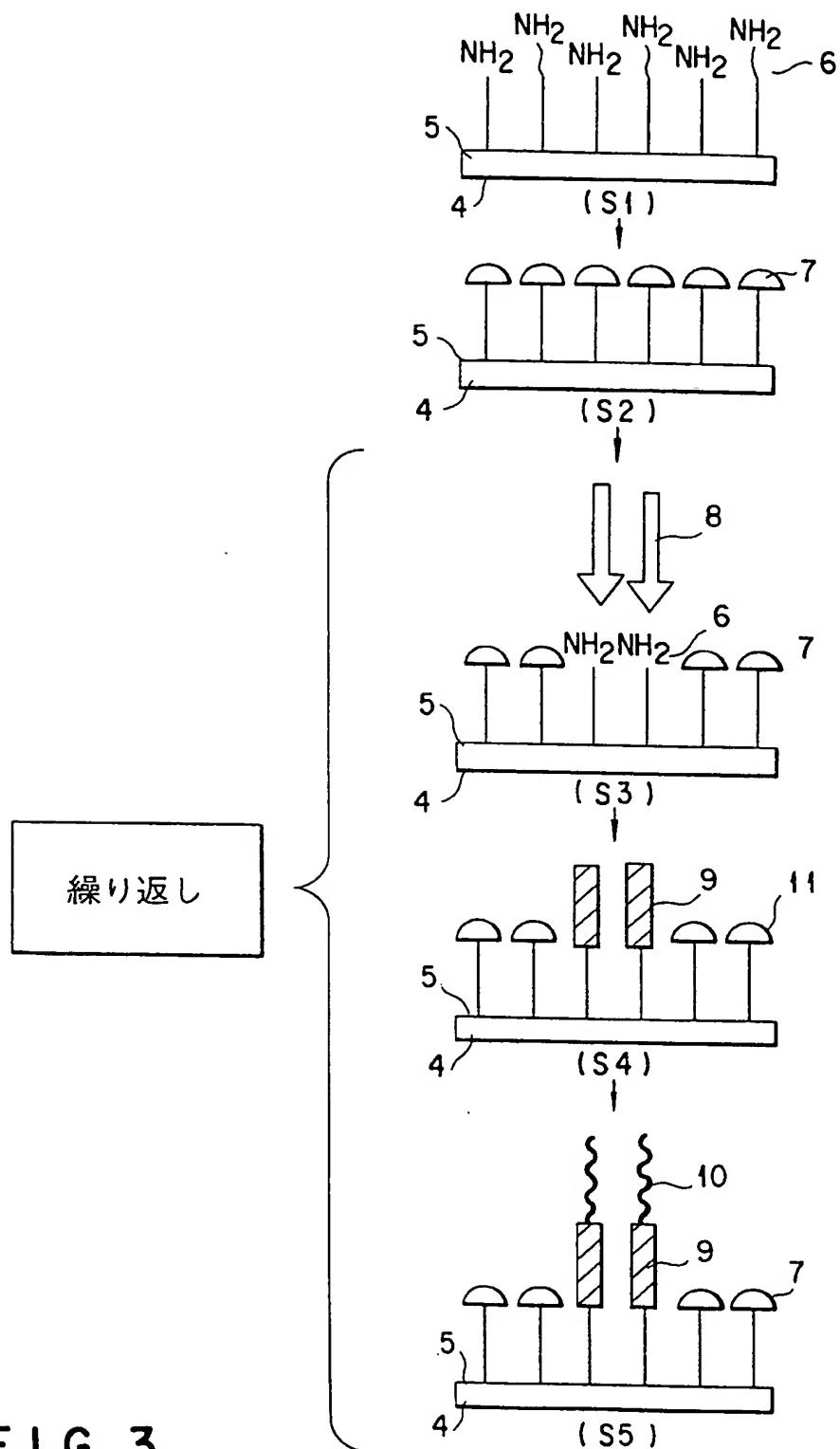


FIG. 3

4/5

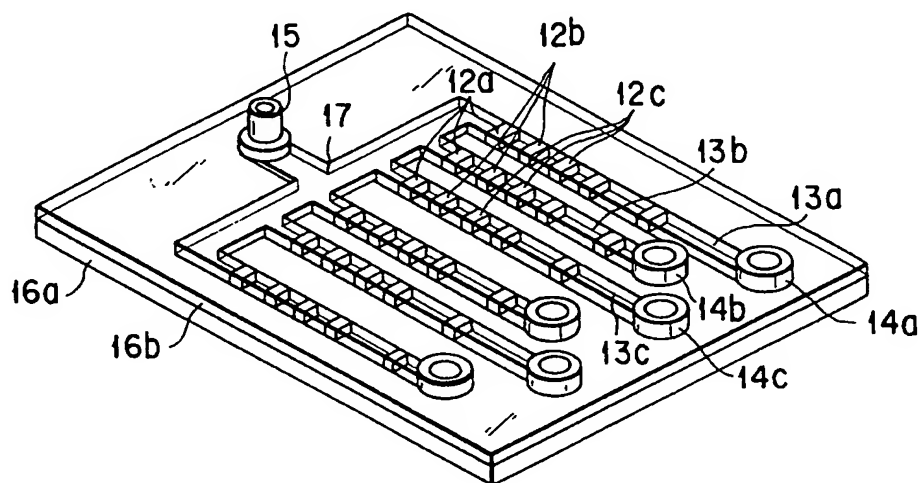


FIG. 4A

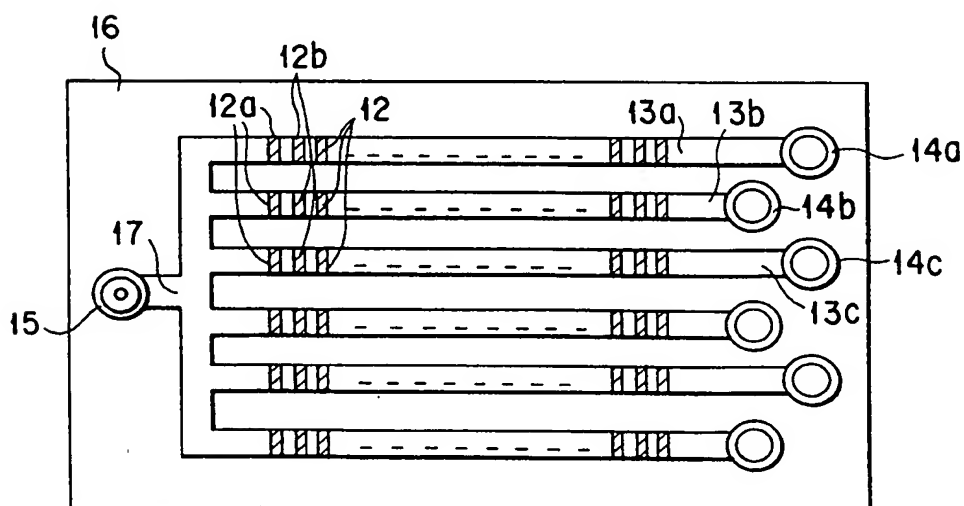


FIG. 4B

5/5

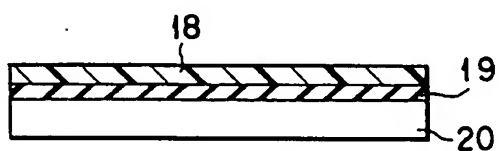


FIG. 5A

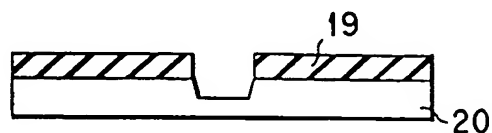


FIG. 5E

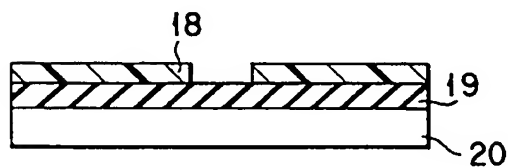


FIG. 5B

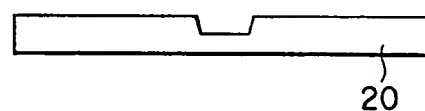


FIG. 5F

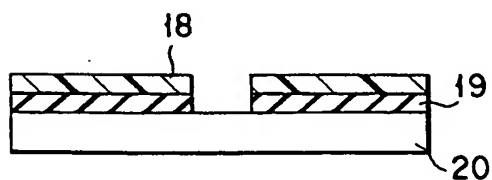


FIG. 5C

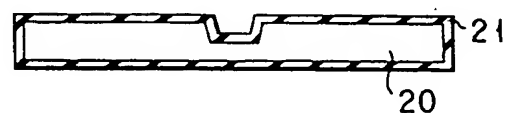


FIG. 5G

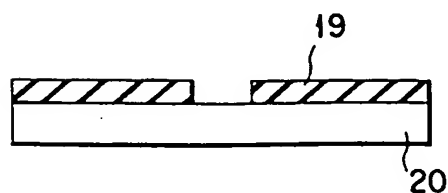


FIG. 5D

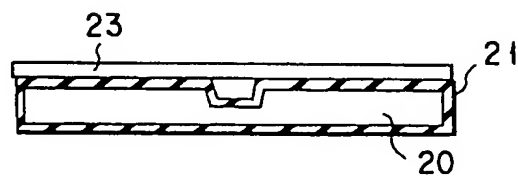


FIG. 5H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP98/03852

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12M1/00, C12N15/09, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12M1/00, C12N15/09, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST File (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 7-506561, A (Affymax Tech. NV.), 20 July, 1995 (20. 07. 95) & WO, 9309668, A1 & EP, 624059, A1 & US, 5384216, A & US, 5412087, A	1-9
A	JP, 7-505529, A (Applied Biosystems Inc.), 22 June, 1995 (22. 06. 95) & WO, 9320236, A1 & EP, 635069, A1 & EP, 636186, A1 & US, 5470705, A & US, 5580732, A & US, 5624800, A & US, 5703222, A	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
2 December, 1998 (02. 12. 98)

Date of mailing of the international search report
15 December, 1998 (15. 12. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl ⁸ C12M 1/00, C12N 15/09, C12Q 1/68		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl ⁸ C12M 1/00, C12N 15/09, C12Q 1/68		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JICSTファイル(JOIS)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 7-506561, A (アフィマックス テクノロジーズ ナムロセ フェノートシヤップ) 20. 7月. 1995 (20. 07. 95) &WO, 9309668, A1 &EP, 624059, A1 &US, 5384216, A &US5412087, A	1 - 9
A	JP, 7-505529, A (アブライト ハイオンシステムズ, インコーポレテッド) 22. 6月. 1995 (22. 06. 95) &WO, 9320236, A1 &EP, 635069, A1 &EP, 636186, A1 &US, 5470705, A &US, 5580732, A &US, 5624800, A &US, 5703222, A	1 - 9
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 02. 12. 98	国際調査報告の発送日 15.12.98	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 小暮 道明 電話番号 03-3581-1101 内線 3449	